

紫苏叶总三萜超声提取工艺优化及对10种常见致病菌的抑菌作用研究^Δ

魏磊^{1*}, 李晓¹, 王学方¹, 景炳年¹, 陈飞¹, 崔炜¹, 郭唯¹, 杜美², 王伟^{1#} (1. 河南省科学院生物技术开发中心, 郑州 450002; 2. 郑州安图生物工程股份有限公司, 郑州 450016)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)16-2193-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.16.08

摘要 目的: 优化紫苏叶总三萜的超声提取工艺, 并考察其对10种常见致病菌的抑菌作用。方法: 以紫苏叶总三萜提取量为响应值, 以料液比、乙醇体积分数、超声时间、超声温度为响应因子, 在单因素试验的基础上, 采用响应面法优化紫苏叶总三萜的超声提取工艺; 采用微量二倍稀释法测定紫苏叶总三萜对10种常见致病菌的最低抑菌浓度(MIC)和最低杀菌浓度(MBC), 以考察其抑菌作用。结果: 优化的紫苏叶总三萜超声提取工艺为料液比1:30[m(g)/V(mL)], 乙醇体积分数85%, 超声时间65 min, 超声温度75 ℃。在此条件下的紫苏叶总三萜提取量为37.90 mg/g, 与预测值(38.40 mg/g)的相对误差为1.30%, 实测值与预测值一致性良好。抑菌作用考察结果表明, 紫苏叶总三萜对10种常见致病菌的MIC范围为0.48~15.50 mg/mL, MBC≥0.97 mg/mL, 整体抑菌作用较强, 尤其对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌的抑菌作用最强。结论: 优化所得紫苏叶总三萜的超声提取工艺稳定、可行; 紫苏叶总三萜具有较强的广谱抗菌作用, 且对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的抗菌作用相当。

关键词 紫苏叶; 总三萜; 超声提取工艺; 响应面法; 致病菌; 抑菌作用; 微量二倍稀释法

Optimization of the Ultrasonic Extraction Technology of Total Triterpenoids from the Leaves of *Perilla frutescens* and Study on Its Antibacterial Activities against 10 Kinds of Common Pathogens

WEI Lei¹, LI Xiao¹, WANG Xuefang¹, JING Bingnian¹, CHEN Fei¹, CUI Wei¹, GUO Wei¹, DU Mei², WANG Wei¹ (1. Biological Development Center, Henan Academy of Sciences, Zhengzhou 450002, China; 2. Zhengzhou Autobio Diagnostics Company Limited, Zhengzhou 450016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To optimize the ultrasonic extraction technology of total triterpenoids from the leaves of *Perilla frutescens* (TPL) and investigate its antibacterial activities against 10 kinds of common pathogens. METHODS: Using the extraction amount of triterpenoids as response value, the ultrasonic extraction technology of TPL was optimized by response surface methodology on the basis of single factor test with solid-to-liquid ratio, ethanol volume fraction, ultrasonic time and temperature as factors. The MIC and MBC of TPL on 10 kinds of common pathogens were detected by double broth dilution method, so as to investigate antibacterial activities. RESULTS: The optimal ultrasonic extraction technology of TPL included solid-to-liquid ratio of 1:30 [m(g)/V(mL)], ethanol volume fraction of 85%, ultrasonic time of 65 min and ultrasonic temperature of 75 ℃. Under these conditions, the amount of triterpenoids was 37.90 mg/g, relative error of which to predicted value (38.40 mg/g) was 1.30%. Measured value agreed well with predicted value. Results of antibacterial activities study showed that MIC were in the range of 0.48-15.50 mg/mL, and MBC≥0.97 mg/mL. TPL showed significant antibacterial activities, especially to *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. CONCLUSIONS: Optimized ultrasonic extraction technology of TPL is stable and feasible. TPL extracted has strong broad-spectrum antibacterial effect and shows similar antibacterial effect on *E. coli*, *S. aureus* and *P. aeruginosa*.

KEYWORDS *Perilla frutescens*; Total triterpenoids; Ultrasonic extraction technology; Response surface methodology; Pathogens; Antibacterial activities; Double broth dilution method

紫苏 [*Perilla frutescens* (L.) Britt.] 为唇形科一年生草本植物, 药食两用, 具有解表散寒、下气消痰、润肺宽肠之功效^[1], 富含色素类、萜类、黄酮类、酚类等多种活性

成分^[2]。植物中所含三萜类化合物因具有抗菌、抗病毒、抗癌、抗炎、降血糖、调控免疫等多种药理活性且毒性较低而受到广泛关注^[3-7]。紫苏叶是紫苏的主要药用部位之一, 而目前针对紫苏叶总三萜的含量、提取工艺及药理活性等方面的研究尚未见报道。

提取是分离和纯化生物活性物质最初且重要的一步, 多种因素(如温度、时间、料液比等)会影响提取效率和产量^[8], 因此优化提取工艺对实现最大程度地提取

Δ基金项目: 河南省科技发展计划项目(No.豫科[2017]9号-172102310345); 河南省重点研发与推广专项拟支持项目(No.374)

*助理研究员, 博士。研究方向: 植物化学及分子生物学。电话: 0371-65353099。E-mail: yhweilei2@163.com

#通信作者: 助理研究员, 博士。研究方向: 天然药物化学。电话: 0371-65353099。E-mail: 250877289@qq.com

生物活性物质十分重要。超声提取技术具有提取效率高、耗能低、不破坏活性物质等优点^[9]。响应面法可以对多种工艺参数及其相互作用的有效性进行分析^[10],近年来在优化黄酮类^[11]、多酚类^[12]等生物活性物质的超声提取工艺中得到广泛应用。鉴于此,本研究采用响应面法对紫苏叶总三萜的超声提取工艺进行了优化,并考察了提取所得的紫苏叶总三萜对10种常见致病菌的抑菌作用,旨在为紫苏叶总三萜的进一步研究提供参考。

1 材料

1.1 仪器

TU-1810型紫外分光光度计(北京普析通用仪器有限责任公司);YJ-VS-2型超净工作台(无锡一净净化设备有限公司);SYQ-DSX-280B型手提式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂);wi93008型麦氏比浊仪[东西仪(北京)科技有限公司];DHP-9082型电热恒温培养箱(上海红华仪器有限公司);KQ-500E型超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司);XMTD-7000型恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂);ME-204型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 菌种与试剂

大肠杆菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)、化脓性链球菌(ATCC 19615)、鼠伤寒沙门氏菌(ATCC 13311)、肺炎链球菌(ATCC 49619)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)、肺炎克雷伯菌(ATCC 700603)均购自南京便诊生物科技有限公司;粪肠球菌、嗜麦芽窄食单胞菌、都柏林沙门氏菌均为河南省科学院天然产物重点实验室保存的临床分离菌株;胰蛋白酶(上海宝录生物科技有限公司,批号:1205026);牛肉浸膏(北京双旋微生物培养基制品厂,批号:000606);琼脂粉(北京索莱宝科技有限公司,批号:1108S0312);D101大孔吸附树脂(天津市光复精细化工研究所,批号:20171119);微量最低抑菌浓度(MIC)测定板(美国Corning公司,批号:07816604);氯化钠(天津市恒兴化学试剂制造有限公司,批号:20170810);齐墩果酸标准品(成都普菲德生物技术有限公司,批号:121213,纯度:≥98%);无水乙醇、香草醛、冰醋酸、高氯酸均为分析纯(北京化工厂),水为蒸馏水。

1.3 药材

紫苏叶样品于2017年5月购于河南省郑州市中草药批发市场,经河南中医药大学陈随清教授鉴定为唇形科植物紫苏[*Perilla frutescens*(L.) Britt.]的干燥叶(或带嫩枝)。

2 方法与结果

2.1 含量测定

采用紫外分光光度法^[13]。

2.1.1 线性关系考察 以甲醇为溶剂制备0.4 mg/mL齐墩果酸标准品溶液,准确吸取0、0.10、0.20、0.30、0.40、0.50 mL,分别置于10 mL量瓶中,水浴挥尽溶剂后,加入新鲜配制的5%香草醛-冰醋酸溶液0.4 mL和高氯酸1 mL,

摇匀,置于60℃水浴中加热30 min,取出冷却至室温,加冰醋酸定容至10 mL,摇匀,于550 nm波长处测定吸光度。以齐墩果酸检测质量浓度(x , mg/mL)为横坐标、吸光度(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=28.175x-0.0073$ ($r=0.9992$)。结果表明,齐墩果酸质量浓度的线性范围为0~0.02 mg/mL。

2.1.2 方法学考察 紫苏叶样品干燥后粉碎,过60目筛,精密称定1.00 g,置于100 mL锥形瓶中,加入60%乙醇溶液20 mL,50℃下超声(功率:500 W,频率:40 kHz,下同)提取40 min,合并滤液,浓缩并定容至10 mL量瓶中,作为供试品溶液。(1)精密度试验:取同一齐墩果酸标准品溶液0.10 mL,按“2.1.1”项下“置于10 mL量瓶中……摇匀”操作,于550 nm波长处连续测定6次吸光度,结果RSD为1.73%($n=6$),表明仪器精密度良好。(2)稳定性试验:取上述供试品溶液7份,分别于室温下放置0、30、60、90、120、150、180 min后于550 nm波长处测定吸光度,结果RSD为0.83%($n=7$),表明供试品溶液在室温下放置180 min内稳定性良好。(3)重复性试验:取上述供试品溶液6份,分别于550 nm波长处测定吸光度,结果RSD为1.30%($n=6$),表明本方法重复性良好。(4)加样回收率试验:取上述供试品溶液适量,共6份,分别加入一定量的齐墩果酸标准品溶液,于550 nm波长处测定吸光度并计算加样回收率,结果加样回收率为97.67%~101.21%(RSD=1.18%, $n=6$)。以上方法学验证结果显示,本方法稳定、可靠,可用于紫苏叶总三萜的含量测定。

2.1.3 紫苏叶总三萜含量的测定 精密称定紫苏叶样品粉末1.00 g,置于100 mL锥形瓶中,按一定料液比加入一定体积分数的乙醇溶液,在一定温度下超声提取一定时间,滤过后按上述条件重复提取2次,合并滤液,浓缩并以一定体积分数的乙醇溶液定容至10 mL,于550 nm波长处测定吸光度,根据回归方程计算总三萜的含量。总三萜提取量=总三萜质量浓度×提取液体积×稀释倍数/紫苏叶样品质量。

2.2 单因素试验

2.2.1 料液比对紫苏叶总三萜提取量的影响 精密称定紫苏叶样品粉末1.00 g,按“2.1.3”项下方法,在60%乙醇溶液、超声时间50 min、超声温度50℃条件下,考察不同料液比[1:10、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35, $m(g)/V(mL)$]对紫苏叶总三萜提取量的影响,结果见图1A。结果显示,随料液比的增大,紫苏叶总三萜的提取量逐渐增加,当料液比为1:30时,提取量不再增加,故为节省试剂选择料液比为1:30。

2.2.2 乙醇体积分数对紫苏叶总三萜提取量的影响 精密称定紫苏叶样品粉末1.00 g,按“2.1.3”项下方法,在料液比1:30、超声时间50 min、超声温度50℃条件下,考察不同乙醇体积分数(20%、40%、60%、80%、100%)对紫苏叶总三萜提取量的影响,结果见图1B。结果显示,随乙醇体积分数的增大,紫苏叶总三萜的提取量逐渐增加,当乙醇体积分数为80%时,提取量最高;而

当乙醇体积分数达100%时,提取量有所降低,这可能是由于紫苏叶中三萜类化合物的极性与80%乙醇溶液最接近,故选择乙醇体积分数为80%。

2.2.3 超声时间对紫苏叶总三萜提取量的影响 精密称定紫苏叶样品粉末1.00 g,按“2.1.3”项下方法,在料液比1:30、80%乙醇溶液、超声温度50℃条件下,考察不同超声时间(20、40、60、80、100 min)对紫苏叶总三萜提取量的影响,结果见图1C。结果显示,随超声时间的延长,紫苏叶总三萜的提取量缓慢增加,当超声时间为60 min时,提取量最高;之后又逐渐降低,这可能是因为超声时间过长会使紫苏叶中三萜类化合物部分发生转化反应,故选择超声时间为60 min。

2.2.4 超声温度对紫苏叶总三萜提取量的影响 精密称定紫苏叶样品粉末1.00 g,按“2.1.3”项下方法,在料液比1:30、80%乙醇溶液、超声时间60 min条件下,考察不同超声温度(40、50、60、70、80℃)对紫苏叶总三萜提取量的影响,结果见图1D。结果显示,随超声温度的升高,紫苏叶总三萜的提取量缓慢上升,当超声温度为70℃时,提取量最高;之后又逐渐降低,这可能是因为超声温度过高会影响紫苏叶中三萜类化合物的稳定性,故选择超声温度为70℃。

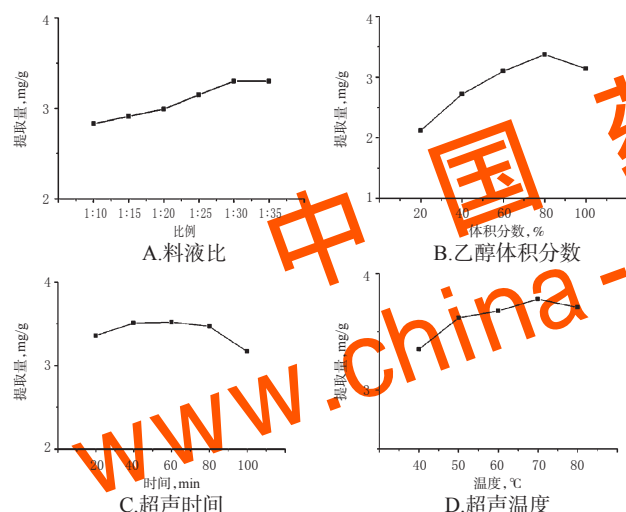


图1 各因素对紫苏叶总三萜提取量影响的单因素试验结果

Fig 1 Single factor test results of the effects of each factor on extraction amount of the yield of TPL

2.3 响应面法优化紫苏叶总三萜的超声提取工艺

2.3.1 响应模型的建立与分析 在单因素试验基础上,采用Box-Behnken响应面设计,以A(料液比)、B(乙醇体积分数)、C(超声时间)、D(超声温度)这4个因素为响应因子,以紫苏叶总三萜提取量为响应值,采用4因素3水平共29组试验对提取工艺进行优化^[14]。因素与水平见表1,试验方案与结果见表2。

采用Design-Expert 8.0.6软件对表2的试验数据进行二次多项式回归拟合,得紫苏叶总三萜提取量(Y)对A、B、C、D的数学回归模型为: $Y=37.504 0+1.675 0A+$

表1 因素与水平

Tab 1 Factors and levels

水平	因素			
	A, g/mL	B, %	C, min	D, °C
-1	1:25	60	40	60
0	1:30	80	60	70
1	1:35	100	80	80

表2 试验方案与结果

Tab 2 Plans and results

试验号	A	B	C	D	紫苏叶总三萜提取量, mg/g
1	0	0	0	0	36.12
2	0	-1	-1	0	31.27
3	1	0	0	-1	29.78
4	1	1	0	0	25.86
5	0	-1	1	0	29.70
6	0	0	1	1	36.27
7	0	0	0	0	38.21
8	0	-1	0	1	31.00
9	-1	0	-1	0	28.78
10	0	1	0	1	35.93
11	1	0	-1	0	34.61
12	1	0	0	1	34.03
13	0	1	1	0	34.14
14	0	0	0	0	38.30
15	0	0	0	0	38.28
16	0	0	0	0	36.61
17	0	1	0	0	30.01
18	-1	0	0	1	29.56
19	0	0	0	-1	28.15
20	0	0	-1	0	32.46
21	0	-1	0	-1	28.77
22	0	-1	-1	0	34.53
23	1	0	1	0	33.21
24	1	-1	0	0	24.80
25	-1	0	0	0	30.14
26	1	-1	0	0	30.96
27	-1	-1	0	0	24.80
28	0	1	0	-1	29.78
29	0	0	-1	1	36.34

$1.366 7B+0.031 666 7C+1.643 3D+1.275 0AB+1.425 0BC+0.965 0BD-5.451 2A^2-5.166 2B^2-0.853 67C^2-1.468 7D^2$ [决定系数(R^2)=0.953 6,调整决定系统(R_{adj}^2)=0.927 8,预测决定系统($P_{red}R^2$)=0.868 6]。对该模型进行方差分析,结果见表3(表中,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$)。

表3 方差分析结果

Tab 3 Analysis results of variance

误差来源	自由度	离均差平方和	均方差	F	P	显著性
A	1	0.34	0.34	29.70	<0.000 1	**
B	1	0.22	0.22	19.77	0.000 3	**
D	1	0.32	0.32	28.59	<0.000 1	**
AB	1	0.065	0.065	5.74	0.027 7	*
BC	1	0.081	0.081	7.17	0.015 4	*
BD	1	0.037	0.037	3.29	0.086 6	
A ²	1	1.93	1.93	170.04	<0.000 1	**
B ²	1	1.73	1.73	152.73	<0.000 1	**
C ²	1	0.047	0.047	4.17	0.056 1	
D ²	1	0.14	0.14	12.34	0.002 5	**
模型	10	4.19	0.42	37.01	<0.000 1	**
残差	18	0.20	0.011			
失拟	14	0.16	0.011	1.02	0.548 4	
净误差	4	0.044	0.011			
总和	28	4.39				

由表3可知,本试验所建模型的 $P < 0.0001$,表明该模型具有显著性;同时,模型失拟项的 $P = 0.5484 > 0.05$,不具有显著性,说明模型与实际情况吻合较好,试验误差较小。方差分析结果得出, R^2 和 R_{adj}^2 分别为0.9536和0.9278,说明该模型拟合度良好; $P_{red}R^2$ 为0.8686,说明该模型预测性能良好。

方差分析结果表明,模型中 A 、 B 、 D 、 A^2 、 B^2 、 D^2 对响应值影响有显著性差异,即各因素对提取量影响大小顺序为 $A > D > B > C$ 。 AB 、 BC 交互作用显著,说明不同提取条件与紫苏叶总三萜提取量并非简单的线性关系。

2.3.2 各因素交互作用分析 响应面等高线的形状可反映交互效应的强弱,圆形表示两因素交互作用不显著,椭圆形表示两因素交互作用显著。从响应面等高线图分布规律和间隔距离可以看出因素间交互作用的强弱和因素对响应值的影响程度^[15]。为确定 A (料液比)、 B (乙醇体积分数)、 C (超声时间)、 D (超声温度)两两交互作用对紫苏叶总三萜提取量的影响,采用Design-Expert 8.0.6软件绘制响应面和等高线图,详见图2。由图2可知,因素 A 与 B 的等高线呈椭圆形,提示二者交互作用最为显著;因素 B 与 C 的交互作用次之;因素 B 与 D 的等高线近似圆形,提示二者交互作用不显著。

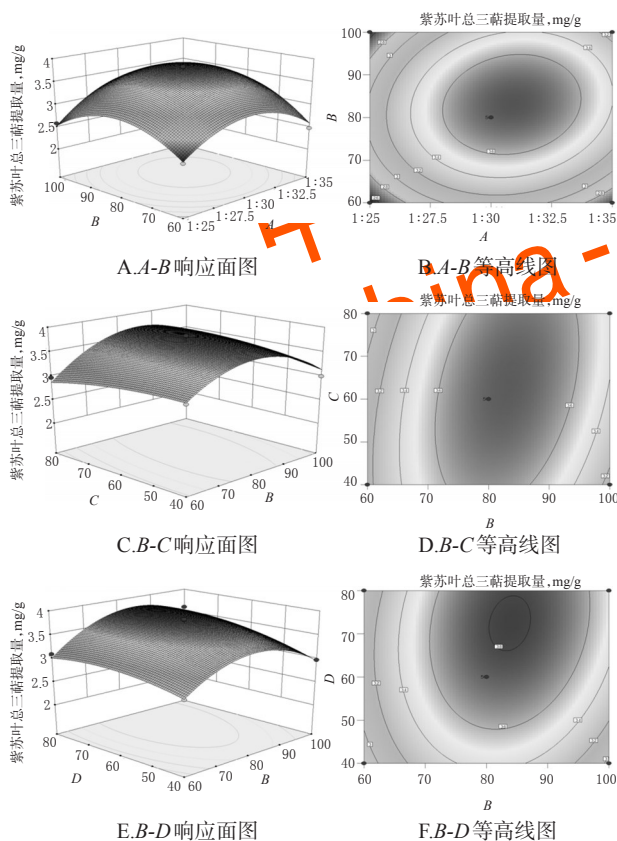


图2 各因素对紫苏叶总三萜提取量影响的响应面和等高线图

Fig 2 Response surface and contour plots for the effects of each factor on extraction amount of the yield of TPL

2.3.3 最优提取工艺的确定及验证试验 采用Design-Expert 8.0.6软件对所建模型进行参数最优分析,得到紫苏叶总三萜的最优提取工艺条件为:料液比1:30.9,乙醇体积分数84.8%,超声时间64.4 min,超声温度76.4 ℃。为适合实际操作,调整后的最优提取工艺条件为:料液比1:30,乙醇体积分数85%,超声时间65 min,超声温度75 ℃。在此条件下进行验证试验,平行操作5次,得紫苏叶总三萜的平均提取量为37.90 mg/g,达到预测提取量(38.40 mg/g)的98.70%,相对误差为1.30%。提示采用响应面法优化所得的紫苏叶总三萜的超声提取工艺稳定、可行。

2.4 抑菌作用研究

2.4.1 紫苏叶总三萜的制备 D101大孔吸附树脂经乙醇和蒸馏水预处理后,湿法装柱,平衡后上样(紫苏叶醇提物),分别用蒸馏水和30%、50%、85%乙醇溶液依次洗脱,收集85%乙醇溶液洗脱液,浓缩,冻干,制备紫苏叶总三萜,称定质量,加入乙醇-水(1:1, V/V)定容至10 mL量瓶中,得质量浓度为31 mg/mL的紫苏叶总三萜母液。

2.4.2 菌悬液的制备 10种致病菌样本复苏后接种于固体培养基(胰蛋白胨10 g/L,牛肉浸膏5 g/L,氯化钠10 g/L,琼脂20 g/L)上,27 ℃培养12~24 h。从平板上选取已纯化的单个菌落,分别混悬于制备好的液体培养基中,制成10种浓度均为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^4$ CFU/mL的菌悬液,备用。

2.4.3 MIC和最低杀菌浓度(MBC)的测定 采用微量二倍稀释法^[16]测定紫苏叶总三萜的MIC和MBC。取“2.4.1”项下的紫苏叶总三萜母液,经0.22 μm微孔滤膜滤过,用制备好的液体培养基(胰蛋白胨10 g/L、牛肉浸膏5 g/L、氯化钠10 g/L)倍比稀释9个梯度浓度后,依次加入微量MIC测定板中,每孔0.1 mL,再分别加入“2.4.2”项下的10种菌悬液,每孔0.1 mL。每个菌种分别设置阳性对照(孔中只加入菌悬液0.1 mL和液体培养基0.1 mL)和阴性对照(孔中只加入液体培养基0.2 mL)。将微量MIC测定板置于37 ℃恒温培养箱中培养24 h后,观察结果,完全没有细菌生长时的最低药物浓度即为MIC。从无细菌生长的各孔取样,分别涂布于无菌琼脂平板培养基上,于37 ℃培养24 h后,观察结果,以平板培养基上无细菌生长的最低药物浓度为MBC。抑菌试验结果见表4。

由表4可知,紫苏叶总三萜对10种常见致病菌的MIC范围为0.48~15.50 mg/mL, $MBC \geq 0.97$ mg/mL,整体抑菌作用较强,且抗菌谱广;尤其是对大肠杆菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)和铜绿假单胞菌(ATCC 27853)的抑菌作用最强。

3 讨论

本研究采用响应面法分析得到紫苏叶总三萜的最优提取工艺为:料液比1:30,乙醇体积分数85%,超声时

表4 紫苏叶总三萜对10种常见致病菌的抑菌试验结果

Tab 4 Results of antimicrobial tests for the effects of TPL on 10 kinds of common pathogens

菌种	革兰氏染色	MIC,mg/mL	MBC,mg/mL
大肠杆菌(ATCC 25922)	阴性	0.48	0.97
金黄色葡萄球菌(ATCC 29213)	阳性	0.97	1.94
铜绿假单胞菌(ATCC 27853)	阴性	0.97	0.97
化脓性链球菌(ATCC 19615)	阳性	1.94	3.88
肺炎链球菌(ATCC 49619)	阳性	1.94	3.88
肺炎克雷伯菌(ATCC 700603)	阴性	3.88	3.88
粪肠球菌	阳性	3.88	7.75
鼠伤寒沙门氏菌(ATCC 13311)	阴性	7.75	15.50
嗜麦芽窄食单胞菌	阴性	15.50	>15.50
都柏林沙门氏菌	阴性	15.50	>15.50

间65 min, 超声温度75 ℃。此条件下得到的紫苏叶总三萜提取量为37.90 mg/g, 验证试验结果显示以上值与理论预测值(38.40 mg/g)的一致性良好, 提示该方法优化所得的紫苏叶总三萜的提取工敢稳定、可行, 可为紫苏叶总三萜的工业化生产提供指导。

本研究还考察了紫苏叶总三萜对10种常见致病菌的抑菌作用。有研究认为, 植物单体化合物或粗提物MIC分别低于1.8 mg/mL时, 可认为其有潜在的治疗价值^[16]。本研究结果显示, 紫苏叶总三萜对其中8种致病菌的MIC为0.48~7.75 mg/mL, 提示其可作为潜在天然广谱抗菌药物加以开发。此外, 革兰氏阴性菌与阳性菌形态不同, 现有的抗阳性菌植物药种类较多, 而抗阴性菌植物药种类较少^[17-18]。紫苏叶总三萜对革兰氏阴性菌和阳性菌表现出的抗菌作用相当, 有助于丰富抗阴性菌植物药种类。但本研究仍存在一定的局限性, 如未确定三萜类化合物的具体种类和成分, 且未对其体内抗菌作用进行评价, 故后续研究将持续进行。

参考文献

[1] 贾佼佼, 李艳, 苗明三. 紫苏的化学、药理及应用[J]. 中医导报, 2016, 31(9): 1354-1356.

[2] 冯林慧, 李迎秋. 紫苏的活性成分及其应用研究[J]. 中国调味品, 2017, 42(9): 177-180.

[3] BISHAYEE A, AHMED S, BRANKOV N, et al. Triterpenoids as potential agents for the chemoprevention and therapy of breast cancer[J]. *Front Biosci*, 2011, 16: 980-996.

[4] 谢健航, 林嘉, 雷林生, 等. 茯苓总三萜抑制小鼠免疫反应及治疗大鼠佐剂性关节炎的实验研究[J]. 中药药理与临床, 2016, 32(6): 89-92.

[5] 王艺玮, 徐盛涛, 徐进宜. 五环三萜羽扇豆烷型天然产物抗肿瘤活性研究进展[J]. 药学与临床研究, 2017, 25(4): 336-342.

[6] 邓鸣, 张炜宁. 异型南五味子总三萜对类风湿关节炎小

鼠抗炎镇痛药效学研究[J]. 安徽医药, 2016, 20(8): 1469-1472.

[7] 诸夔姐, 吴正凤, 蒋翠花, 等. 三萜类化合物降血糖活性及其作用机制研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2015, 46(6): 764-770.

[8] CHE SULAIMAN IS, BASRI M, FARD MASOUMI HR, et al. Effects of temperature, time, and solvent ratio on the extraction of phenolic compounds and the anti-radical activity of *Clinacanthus nutans* Lindau leaves by response surface methodology[J]. *Chem Cent J*, 2017. DOI: 10.1186/s13065-017-0285-1.

[9] 贾韶千, 吴彩娥, 李艳霞. 枸杞中黄酮类化合物的超声波强化提取[J]. 农业机械学报, 2009, 40(5): 130-134.

[10] BAI X, YUE T, YUAN Y, et al. Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from apple pomace using response surface methodology and HPLC analysis[J]. *J Sep Sci*, 2010, 33(23/24): 3751-3758.

[11] 李师, 雷艳萍, 石晓峰, 等. 雪松松针总皂苷的超声提取工艺优选及体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国药房, 2016, 27(31): 4406-4410.

[12] 李峰, 王延伟, 俞力超, 等. 四角菱茎多酚的超声提取工艺优化及体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国药房, 2016, 27(31): 4411-4417.

[13] 贾瑞博, 赵慧, 刘凯丽, 等. 树干灵芝总三萜提取工艺优化及其抗氧化作用研究[J]. 应用化工, 2016, 45(6): 1030-1035.

[14] 谢勇, 张榕, 张江湖, 等. Box-Behnken 试验设计优化刺梨果汁饮料工艺[J]. 食品研究与开发, 2018, 39(2): 119-126.

[15] 曲吴杨, 朱文学, 刘琛, 等. 苹果渣果胶提取工艺优化及碱法降酯效果评价[J]. 食品科学, 2014, 35(14): 87-92.

[16] WEI L, ZHANG W, YIN L, et al. Extraction optimization of total triterpenoids from *Jatropha curcas*, leaves using response surface methodology and evaluations of their antimicrobial and antioxidant capacities[J]. *Electron J Biotech*, 2015, 18(2): 88-95.

[17] HERRERA RM, PÉREZ M, MARTÍN-HERRERA DA, et al. Antimicrobial activity of extracts from plants endemic to the Canary Islands[J]. *Phytother Res*, 2015, 10(4): 364-366.

[18] NOSTRO A, GERMANÓ MP, D'ANGELO V, et al. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity[J]. *Lett Appl Microbiol*, 2000, 30(5): 379-384.

(收稿日期: 2018-02-09 修回日期: 2018-05-21)

(编辑: 陈宏)